

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 6 C12N 15/54, 5/00		A1	(11) 国際公開番号 WO 95/14094
			(43) 国際公開日 1995年5月26日 (26.05.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01956 (22) 国際出願日 1994年11月18日 (18. 11. 94)		(81) 指定国 AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (KE, MW, SD, SZ).	
(30) 優先権データ 特願平5/314212 1993年11月19日 (19. 11. 93) JP			
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) (JP/JP) 〒150 東京都渋谷区神宮前六丁目26番1号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 西沢 治 (NISHIZAWA, Osamu) (JP/JP) 戸栗敏博 (TOGURI, Toshihiro) (JP/JP) 〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外 (SATO, Kazuo et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title : DNA CHAIN CODING FOR GLYCERO-3-PHOSPHATE ACYLTRANSFERASE AND USE THEREOF

(54) 発明の名称 グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼをコードするDNA鎖およびその使用

(57) Abstract

A DNA chain having a base sequence coding for a polypeptide having a glycerol-3-phosphate acyltransferase (ATase) activity and a specified amino acid sequence substantially originating in spinach. It is possible by introducing the DNA chain into a cold-sensitive plant for causing expression to give the plant an increased cold resistance as compared with the case wherein use is made of a known ATase gene originating in a cold-resistant plant.

(57) 要約

グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (A T a s e) 活性を有してアミノ酸配列が実質的にホウレンソウ由来の特定の A T a s e のポリペプチドをコードする塩基配列を有する D N A 鎖およびその用途が開示されている。

この D N A 鎖を低温感受性植物に導入して発現させることにより、既知の低温耐性植物由来の A T a s e 遺伝子を用いた場合よりさらに強い耐冷能を植物に付与することができる。

情報としての用途のみ

P C T に基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁に P C T 加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	DE	ドイツ
BB	バルバドス	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BE	ベルギー	GB	イギリス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BG	ブルガリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BR	ブラジル	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SS	ス威士ランド
CA	カナダ	GU	グアム	MG	マダガスカル	SN	セネガル
CC	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	ML	マリ	TD	チャド
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MN	モンゴル	TG	タンザニア
CH	スイス	JP	日本	MR	モーリタニア	TH	タイ
CI	コート・ジボワール	KE	ケニア	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CM	カメルーン	KR	韓国	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CN	中国	KZ	カザフスタン	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
DE	ドイツ			NO	ノルウェー	US	米国
DK	デンマーク			NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
				PT	ポルトガル	VN	ベトナム
				RO	ルーマニア		

明 細 書

グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼをコードするDNA鎖およびその使用

技 術 分 野

本発明は、ホウレンソウ (Spinacia oleracea L.) が産生するようなグリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (以下 A T a s e という) の生物工学的産生能を有するDNA鎖およびその使用に関するものである。

背 景 技 術

植物の生体膜を構成する脂質は、外界温度の低下により液晶状態から固体状態に変化する。それに伴い生体膜の性質が変化する。固体状態では物質透過の選択性がなくなるため、本来の機能を果たせなくなり、その結果細胞に障害が生ずると考えられている。脂質のうち、ホスファチジル・グリセロール (以下 P G という) は液晶状態から固体状態に変化する温度が高く、高温で固まりやすい脂質である。従って P G の性質により生体膜の温度感受性が大きく変化する。ところで、P G の固まりやすさは、それを構成している脂肪酸の種類により決定される。グリセロール - 3 - リン酸 (以下 G - 3 - P という) への脂肪酸の転移は A T a s e により行われる。即ち、

脂肪酸とアシルキャリア - タンパク (以下 A C P という) の複合体から脂肪酸の部分が G - 3 - P へ転移する反応を A T a s e が触媒する。

植物では、脂肪酸合成は専ら葉緑体内で起こり、A T a s e の基質となる脂肪酸と A C P の複合体はパルミトイル - A C P (以下 16 : 0 - A C P という) およびオレオイル - A C P (以下 18 : 1 - A C P という) の2種類である。A T a s e がそのいずれの基質を選択するかは A T a s e 自体の性質、即ち A T a s e の基質選択性に依存する。A T a s e の基質選択性については、種々の植物で調べられている。例えば低温耐性植物であるハウレンソウおよびエンドウの A T a s e は 18 : 1 - A C P に対する基質選択性が高く、これらの植物の P G は比較的低温でも液晶状態である [ユーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Eur. J. Biochem. 129 (1983) 629-636)]。それに対して、低温感受性植物の A T a s e は、16 : 0 - A C P と 18 : 1 - A C P とを区別せず、それぞれの脂肪酸をほぼ同じ割合で転移するため、カボチャの P G は比較的高温で固化する (詳細後述)。

低温耐性植物の A T a s e のうち、全アミノ酸配列が解明されているのは、シロイヌナズナとエンドウのもののみである。シロイヌナズナの A T a s e の構造は、
「グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ

をコードする D N A 鎖」 として特許出願されている（特開平 1 - 2 3 5 5 9 4 号公報参照）。

細胞質で合成されて葉緑体へ転移するタンパクには、「転移ペプチド」がそのアミノ末端側に必要であるといわれている〔ネイチャー (Nature 313 (1985) 358-363)〕。

発 明 の 開 示

ホウレンソウの P G 中の飽和分子種含量は、エンドウの約 3 分の 1、またシロイヌナズナの約 4 分の 1 であり、さらに、ホウレンソウ A T a s e の 1 8 : 1 - A C P に対する基質選択性は、エンドウの約 2 倍、またシロイヌナズナの約 3 倍であることが本発明者らによって確認された。従って、ホウレンソウ A T a s e の遺伝子は、低温感受性植物に耐冷能を付与するうえで、従来知られているものよりもはるかに優れていると思われる。ホウレンソウ A T a s e のアミノ酸配列は、全体としてシロイヌナズナおよびエンドウのものと類似しているが、局所的に異なる領域があり、A T a s e の基質選択性の差はこれらの領域に起因すると想像される。

本発明は、葉緑体の膜脂質 P G の性質を変換するのに有用な A T a s e の生物工学的産生能を有する D N A 鎖およびその用途を提供するものである。

本発明者は、ホウレンソウ A T a s e の c D N A を、4 種の植物由来 A T a s e の c D N A をプローブとする方法で得ることは困難であったため、これらの植物由来

A T a s e のアミノ酸配列に着目して相同性の高い領域を選び出して対応するDNAを合成し、これらを組み合わせてプライマーとしてcDNA/mRNAハイブリッドを鋳型としてPCR法によりプライマー間を含むDNAを合成し、このDNA断片をプローブとして用いることによりcDNAライブラリーから得ることができた。

本発明によるグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼの生物工学的産生能を有するDNA鎖は、グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号：1に示されているアミノ酸配列のうち103位から472位まで（または、第5図および6図に示されているアミノ酸配列のうちAからBまで）のものであるポリペプチドをコードする塩基配列を有すること、を特徴とするものである。

ハウレンソウ由来のA T a s e のアミノ酸配列およびその遺伝子の塩基配列を解明したのは本発明が初めてである。

また、本発明は上記のDNA鎖の用途、具体的には該DNAを植物細胞に組み込んでその特性を変化させた植物およびそのような特性の変化を付与する方法に関する。

すなわち、本発明は、上記のDNAが組み込まれ、このDNAの発現によってこのグリセロール-3-リン酸

アシルトランスフェラーゼが産生されていることにより、脂質に結合した脂肪酸中の不飽和脂肪酸が本来の組成よりも高くなったものであることを特徴とする植物に関し、また、上記のDNAを植物細胞に組み込み、培養植物体中でこのDNAを発現させ、その結果としてこのグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼを産生させることにより、この植物の脂質に結合した脂肪酸中の不飽和脂肪酸の含量を本来の組成よりも高くすることを特徴とする、植物の脂質中の脂肪酸組成を変化させる方法、にも関する。

また他の側面では、本発明は、本来低温傷害を受ける植物であって、上記のDNAが組み込まれ、このDNAの発現によってこのグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼが産生され、この植物の細胞の生体膜中に含まれているホスファチジルグリセロールに結合した脂肪酸中の不飽和脂肪酸の含量が本来の組成よりも高くなったことにより、この植物に本来傷害を受ける温度より低い温度でも傷害を受けないようになったものであることを特徴とする植物に関し、また、上記のDNAを植物細胞に組み込み、培養植物体中でこのDNAを発現させ、その結果としてこのグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼを産生させ、この植物細胞の生体膜中に含まれているホスファチジルグリセロールに結合した脂肪酸の組成を変化させて不飽和分子種含量を高め

ることにより、本来低温傷害を受ける植物に、この植物が本来傷害を受ける温度より低い温度でも傷害を受けない性質を与えることを特徴とする、植物の温度に対する感受性を変化させる方法にも関する。

図面の簡単な説明

第1図は、カボチャATaseのcDNAをプローブとして5種類の植物のmRNAをノーザン解析した結果を示す説明図である。

レーン1～5にはそれぞれカボチャ、ホウレンソウ、オオムギ、イネおよびエンドウ由来のpoly(A)⁺RNAが電気泳動後転写されている。

第2図は、4種類の植物由来ATaseの公知のアミノ酸配列の比較を示す説明図である。

1～6の下線を引いた部分はPCRのプライマーを合成するのに用いた領域を示す。アミノ酸配列の左側の数字は、報告されているN末端アミノ酸を1番とした時のアミノ酸の番号を示す。

第3図は、第2図に続く、アミノ酸配列の比較を示す説明図である。

第4図は、ホウレンソウATaseのcDNAクローンSpAT#1とSpAT#4の位置関係と簡単な制限酵素地図を示す説明図である。

太線はオープンリーディングフレームを示す。

第5図は、ホウレンソウATaseのcDNAのヌクレオチド

配列およびアミノ酸配列を示す説明図である。

第6図は、第5図に続く配列を示す説明図である。

第7図は、ハウレンソウ ATase の cDNA をプローブとしたノーザン解析の結果を示す説明図である。

発明を実施するための最良の形態

A T a s e 遺伝子

定 義

本発明による A T a s e の生物工学的産生能を有する D N A 鎖即ち A T a s e 遺伝子は、A T a s e 活性を有してアミノ酸配列が実質的に配列番号：1に示されているアミノ酸配列のうち103位から472位まで（または、第5図および6図に示されているアミノ酸配列のうちAからBまで）のものであるポリペプチドをコードするもの、である。ここで「D N A 鎖」とはある長さを有するポリデオキシリボ核酸鎖を意味するものである。そして、本発明ではこの「D N A 鎖」はそれがコードするポリペプチドのアミノ酸配列（後述する改変または修飾されたものを包含する）によって特定されるところ、このポリペプチドは上記のように有限のものであるから、この「D N A 鎖」（後述する縮重異性体を包含する）も有限のものである。しかし、この D N A 鎖は、A T a s e をコードする遺伝子を含んでいてこのポリペプチドの生物工学的産生を行わせるのに有用なものであるところ、この有限の長さの D N A 鎖のみによって行え

るのではなく、その5' -側上流および3' -側下流に適当な長さのDNA鎖が結合した状態でこのポリペプチドの生物工学的産生が可能となるわけである。

また、A T a s eが細胞質で合成されて葉緑体に転移するためには成熟A T a s eのアミノ末端側に転移ペプチドが必要とされていることは前記したところである。従って細胞質で合成されたA T a s eを葉緑体に転移させる必要がある場合には、A T a s eをコードする遺伝子は5' 側上流にこの転移ペプチドをコードするDNA鎖を持つことが必要になる。

従って、本発明で「DNA鎖」というときは、この特定の長さ（配列番号：1の配列のうち103位のアミノ酸から472位のアミノ酸までの長さ：第5図および6図の対応アミノ酸でいえばAからBの長さ）のもののほかに、この特定の長さのDNA鎖を構成員とする鎖状または環状DNA鎖の形態にあるものを包含するものとする。

本発明によるDNA鎖の代表的存在形態は、プラスミドまたはファージDNAの中に構成員の一部としてこのDNA鎖が挿入された形態、並びにプラスミドまたはファージあるいはゲノムDNAの中に挿入された形で微生物（特に細菌）またはファージ粒子あるいは植物の中に存在する形態である。ここでいう細菌が、大腸菌やアグロバクテリウムを含むことはいうまでもない。

本発明によるDNA鎖の好ましい存在形態は、
A T a s e 遺伝子が植物中で安定に発現しうるように、
プロモーター、翻訳調節領域をコードするDNA鎖、葉
緑体への転移ペプチドをコードするDNA鎖、本発明に
よるDNA鎖、翻訳終止コードンをコードするDNA鎖、
ポリ(A)付加シグナルをコードするDNA鎖およびタ
ーミネーターとが一体に結合して、これがゲノムに挿入
された形態で植物中に存在するものである。プロモータ
ー、翻訳調節領域をコードするDNA鎖、翻訳終止コー
ドンをコードするDNA鎖、ポリ(A)付加シグナルを
コードするDNA鎖およびターミネーターとしては、公
知のものを適宜組み合わせて用いることができる。葉緑
体への転移ペプチドをコードするDNA鎖は本発明で得
られたA T a s e 遺伝子のもの(配列番号: 1 (または
第5図)の塩基番号238-360、または55-36
0)でもよいし、公知のもの、例えばエンドウのリプロ
ース-1, 5-ニリン酸カルボキシラーゼの小サブユニ
ット遺伝子のものを用いることもできる。

この遺伝子がコードするポリペプチド

上記のように、本発明によるDNA鎖は、これがコー
ドするアミノ酸配列によって特定されている。このポリ
ペプチドは、A T a s e 活性を有していてアミノ酸配列
が実質的に配列番号: 1に示されているアミノ酸配列の
うち103位から472位まで(または、第5図および

6 図に示されているアミノ酸配列のうち A から B まで)のものである(第 6 図が 5 図のつづきであることはいうまでもない)。ここで「アミノ酸配列が実質的に配列番号: 1 に示されているアミノ酸配列のうち 1 0 3 位から 4 7 2 位までのもの」ということは、このポリペプチドが A T a s e 活性を有するかぎりアミノ酸の幾つかについて欠失、置換、付加などがあってもよいことを示すものである。

配列番号: 1 (または第 5 図および 6 図) に示されているアミノ酸配列のうち(6 1 位から 1 0 2 位(C から A)または 1 位から 1 0 2 位(C' から A)までの部分は、カボチャ A T a s e との構造比較から、転移ペプチドの少なくとも一部であると思われる。この部分もまた、上記したアミノ酸配列についての各種の改変または修飾を包含するものとする。

本発明での典型的な A T a s e 活性を有するポリペプチドは配列番号: 1 (または第 5 図および 6 図) のアミノ酸配列のうち 1 0 3 位から 4 7 2 位(A から B) [または 6 1 位から 4 7 2 位(C から B)、または 1 位から 4 7 2 位(C' から B)] までのものであって、3 7 0 個(または 4 1 1 個、または 4 7 2 個)のアミノ酸からなり、従来そのアミノ酸配列は知られていなかったものである。

本発明で対象とする A T a s e は、E C 2 . 3 . 1 .

15で特定される酵素である。

DNA鎖の塩基配列

A T a s e をコードするDNA鎖は、配列番号：1（または第5図および6図）の361位から1470位（AからB）〔または238位から1470位（CからB）、または55位から1470位（C'からB）〕の塩基配列をもつものまたはその縮重異性体、並びに上記の様なA T a s e のアミノ酸配列の変化に対応する塩基配列をもつものまたはその縮重異性体、である。ここで、「縮重異性体」とは、縮重コードンにおいてのみ異なっていて同一のポリペプチドをコードすることのできるDNA鎖を意味する。たとえば配列番号：1（または第5図および6図）の361位から1470位（AからB）〔または238位から1470位（CからB）、または55位から1470位（C'からB）〕の塩基配列をもつDNA鎖にたいして、そのアミノ酸のどれかに対応するコードン例えばA s nに対応するコードン（A A C）が、これと縮重関係にある例えばA A Tに変わったものを本発明は縮重異性体と呼ぶものとする。

本発明によるDNA鎖の好ましい具体例は、3' - 側末端に接して少なくとも1個の停止コードン（例えばT A G）を持つものである。また、本発明のDNA鎖の5' - 側上流および（または）3' - 側下流には、非翻訳領域としてのDNA鎖がある長さ続いてよい。

D N A 鎖 の 取 得

上記の A T a s e のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する D N A 鎖を取得する方法は、核酸合成の方法に従ってその D N A 鎖の少なくとも一部を化学合成することである。

A T a s e のアミノ酸残基数が少なくとも 370 個であるということを考えれば、この化学合成法よりも、ホウレンソウの葉および（または）茎由来の m R N A から遺伝子工学の分野で慣用されている方法例えば岡山・バーグ法〔モレキュラー・アンド・セル・バイオロジー (Mol. Cell Biol. 2 (1982) 161-170)〕により m R N A に相補的な D N A のライブラリーを取得し、これも慣用されている方法例えば適当なプローブによる免疫学的方法による取得あるいはハイブリダイゼーション法による取得が好ましいと言える。

これまでに、4 種類の植物（カボチャ、シロイヌナズナ、エンドウ、キュウリ）から A T a s e 遺伝子が単離され、その D N A 構造が明らかにされている。本発明者は、これら A T a s e のアミノ酸配列を詳細に比較することにより、いくつかの保存配列から合成した D N A をプライマーとし、またホウレンソウ m R N A を鋳型として P C R を行うことにより、ホウレンソウ A T a s e の c D N A 断片を取得した。この断片をプローブとして、λファージを用いたホウレンソウ c D N A ライブラリー

をスクリーニングすることにより、本発明のDNA鎖を取得した（詳細は後記実施例参照）

形質転換

上述のように、本発明によりハウレンソウ由来のA T a s eをコードするDNA鎖が提供された。酵素学的研究からハウレンソウ由来のA T a s eは、そのDNA構造が既知の低温耐性植物（シロイヌナズナおよびエンドウ）由来のA T a s eよりも18:1-ACPに対する基質選択性が高いことが本発明者らによって確認され（シロイヌナズナおよびエンドウについてはEur. J. Biochem. 129 (1983) 629-636: PCT/JP92/00024 参照）、本発明のDNA鎖を低温感受性植物（たとえば、イネ、トウモロコシ、ヤマイモ、サツマイモ、キュウリ、ピーマン、ナス、カボチャ、バナナ、メロン、シクラメン、ユリ、バラ、ヒマ、ヘチマ、タバコなど）に導入し発現させれば、既知の遺伝子を用いた場合よりもさらに強い耐冷能を植物に付与することができる。

上述した本発明DNAを発現させてそれがコードするポリペプチド（A T a s e）を産生させるためには、本発明によるDNAの他に適当なプロモーター、葉緑体への転移ペプチドをコードするDNA鎖、翻訳終止コードをコードするDNA鎖、ポリ（A）付加シグナルをコードするDNA鎖およびターミネーターなどの発現調節配列が一体に結合した形で植物細胞に導入される必要が

ある。プロモーターとしては、例えばカリフラワーモザイクウィルス 35 s プロモーター、ノパリン合成酵素のプロモーター、リブローズニリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ小サブユニットのプロモーターなど、ターミネーターとしては、ノパリン合成酵素のターミネーター、オクトピン合成酵素のターミネーターなどを適宜組み合わせて用いて公知の方法により本発明 DNA 鎖を植物細胞に導入（形質転換）し、培養により形質転換植物体を得ることができる。葉緑体への転移ペプチドをコードする DNA 鎖は本発明で得られた A T a s e 遺伝子のもの（配列番号：1（または第 5 図）の塩基番号 238 - 360、または 55 - 360）でもよいし、公知のもの、例えばエンドウのリブローズ - 1, 5 - ニリン酸カルボキシラーゼの小サブユニット遺伝子のものを用いることもできる。

植物に外来遺伝子を導入する方法としては、すでに報告され確立されている種々の方法、たとえばアグロバクテリウムの T i プラスミドをベクターとして用いる方法や、植物プロトプラストにエレクトロポレーションで遺伝子を導入する方法などを、遺伝子を導入しようとする植物に応じて適宜用いることができる（たとえば 'Plant genetic transformation and gene expression; a laboratory manual', Draper, J. et al. eds., Blackwell Scientific Publications, 1988 参照）。外来

遺伝子導入のための植物材料としては、葉片、茎片、塊茎片、プロトプラスト、カルス、花粉、花粉管などの中から適当なものを選ぶことができる。

本発明によりホスファチジルグリセロールの飽和分子種、すなわち生体膜の相分離を引き起こし植物の低温傷害の原因となる脂質分子種を大幅に減じ、その結果低温に耐性の植物を得ることができる。

例

以下実施例をあげて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

実施例 1 ホウレンソウ cDNAライブラリーの作製

約 10 g のホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L. var. *grabra* Viroflay / 渡辺採種場 (宮城県) より入手) の子葉よりシャーグウィン (Chirgwin) らの方法 [Biochemistry, 18 (1979) 5294-5299] に従って全 RNA を得た。この全 RNA からアビブ (Aviv) らの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69 (1972) 1408-1412] に従ってポリ A を有する RNA [poly(A)^+ RNA] を分離した。

上記の poly(A)^+ RNA に対して相補的な DNA (cDNA) をガブラー (Gubler) らの方法 [Gene, 25 (1983) 263-269] に従って合成した。この際、プライマーとしてオリゴ (dT) およびランダムオリゴヌクレオチドを使用した。合成した二本鎖 cDNA を EcoRI メチラーゼで処理して制限酵

素EcoRIの切断部位をメチル化した後、EcoRI リンカー (dGGAATTCC; 宝酒造製) を両末端に付加した。次に制限酵素EcoRIで余分なリンカーを切断除去し、遊離のリンカーをゲル濾過法でcDNA画分から除き、cDNAとファージ λ gt11のアームとを連結した。続いて、このDNAを λ ファージ粒子(Gigapack Gold; Stratagene製)にパッケージングし、 λ gt11でのハウレンソウcDNAライブラリーを得た。

実施例 2 ライブラリースクリーニング用プローブの調製

植物のATaseとして、カボチャおよびシロイヌナズナ由来のDNA構造が知られていた。従って、これらのDNAをプローブとして上記ハウレンソウcDNAライブラリーをスクリーニングし、ハウレンソウATaseのcDNAを取得する方法が常套手段と思われる。しかし、その方法が可能であるためにはハウレンソウのゲノムDNAとプローブDNAのホモロジーが高いことが必要である。そこで、カボチャおよびシロイヌナズナATaseのcDNAをプローブとして、ハウレンソウmRNAをノーザン解析した。mRNAの調製は、上記の方法に従った。カボチャ、ハウレンソウ、オオムギ、イネおよびエンドウのpoly(A)⁺ RNA各5 μ gをグリオキサールで変性後、1.5%アガロースゲルで電気泳動し、分離したpoly(A)⁺ RNAをナイロンメンブレン(GeneScreen Plus; DuPont製)へ転写させ、上

記 cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションは、 $6 \times \text{SSPE}$ [$1 \times \text{SSPE}$ は 10 mM リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.0$), 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl]、 0.2% SDS および $100 \mu\text{g/ml}$ ニシン精子 DNA から成る液中で 60°C 、 16 時間行なった。その後、メンブレンを $2 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}$ は 0.15 M NaCl、 15 mM クエン酸ナトリウム) 液中で室温、 15 分を 2 回、次いで 42°C 、 15 分を 2 回振蕩して洗った。カボチャ ATase の cDNA をプローブとした時のオートラジオグラム (模写) を第 1 図に示す。カボチャおよびシロイヌナズナ ATase の cDNA をプローブとするとカボチャおよびエンドウ mRNA 中に約 2 kb のバンドが検出されるが、ホウレンソウ mRNA 中にはバンドが何も検出されなかった。従って、カボチャおよびシロイヌナズナ ATase の cDNA をプローブとするスクリーニングではホウレンソウ ATase の cDNA を取得することは困難と判断した。

そこで、 4 種 (その後、新たに 2 種の植物由来 ATase の DNA 構造が明らかになったため) の植物由来 ATase のアミノ酸配列を比較すると、比較的相同性が高い領域が幾つかあることが明らかとなった (第 2 ~ 3 図)。そのように相同性の高い領域からそれぞれ DNA を合成し、それらを 2 つずつ組み合わせてプライマーとし、プライマーで挟まれた部分の DNA を PCR (Polymerase Chain Reaction) により取得することを試みた。第 2 ~ 3 図中

の下線を引いた部分に対応するDNAを合成した (Model 394 DNA/RNA Synthesizer; Applied Biosystems 製)。それぞれをプライマー1～6と呼び、以下にその配列を示す。

1. 5' -TTGCTGCAGGAATGGAAGAA
2. 5' -GAGAGCCTTTTGA (TまたはC) TACTACA
3. 5' -TGTGTTTATTCGAAAAAGCACATG
4. 5' -CATGTGCTTTTTTGA (AまたはG) TAAACACA
5. 5' -GAAGAAGCATCAAAGGGTGC
6. 5' -GGAGGGGGCAT (GまたはT) ATGTCAT

このうち1～3がセンス鎖、4～6がアンチセンス鎖に対応する。PCR反応では、それぞれのグループから1つずつ選んだプライマーセット (9セット) を使用した。PCR反応に用いる鋳型としてゲノムDNA、cDNAライブラリー由来DNA等も考えられるが、ここでは、mRNAを鋳型として逆転写酵素によってcDNAを合成し、cDNA/mRNAハイブリッドを形成させこれを鋳型として用いた。この反応は、Gene AmpTM RNA PCR Kit (宝酒造製) に拠った。1本鎖目cDNAの合成反応液は、50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 4 mM DTT, 80 mM MgCl², 0.8 mM dNTPs, 20 μg/mlの 6mer random oligo DNA, 20 U RNase inhibitor, 2 μg/ml poly(A)⁺ RNA, 50 U 逆転写酵素の計20 μlの液からなり、ミネラルオイルを100 μl 重層し、42℃で1時間反応した。なお、ハウレンソ

ウ mRNA と並行してコントロールとしてカボチャ mRNA も鋳型として使用した。反応終了後 95℃ で 5 分間処理することにより逆転写酵素を不活化させた。続いて、1 本鎖目 cDNA の合成反応液に前述したプライマーをそれぞれ 20 μM 入れ 2 本鎖目を合成した。この際、PCR は 95℃ (1 分), 55℃ (1 分), 72℃ (2 分) を 1 サイクルとして 35 サイクル行なった。但し、1 サイクル目の 95℃ のみ 3 分間とした。反応終了後 100 μl のクロロホルムでミネラルオイルを抽出して水層を回収し、次いで 100 μl のエーテルでクロロホルムを除去して得た水層から、10 μl を取り出し 1% アガロースゲル電気泳動により合成した DNA を分離後解析した。その結果、3 と 6 のプライマーセットのみでハウレンソウおよびカボチャの mRNA から、共に約 300 bp の増幅された DNA 断片が観察された。一方、他の 8 種類の組み合わせでは、カボチャ mRNA 由来の増幅された DNA 断片と大きさが一致するバンドは、ハウレンソウ mRNA 由来の DNA 中には認められなかった。この増幅された DNA 断片は、両端を Klenow フラグメントで平滑化した後、プラスミド pTZ18R (Pharmacia 製) の SmaI 部位にクローニングした。DNA の塩基配列は、蛍光シーケンサーを用いたダイデオキシ法 (Applied Biosystems 製) により決定した。その結果得られた塩基配列から推定されたアミノ酸配列は既知の植物由来 ATase と有意の一致を示した。

実施例 3 ATase cDNA保持株のスクリーニングとcDNAの単離

上記のようにして得られたDNA断片をプローブとして、cDNAライブラリーのスクリーニングを行なった。まず、ハウレンソウcDNAを含む組換え体ファージを大腸菌Y1090 (r-)株に感染させ、直径約15 cmのプレートに約3万個のプラークを形成させた40枚のプレートを調製し、ファージをナイロンメンブレン (Hybond-N+; Amersham製) に転写した。プローブDNAはMultiprime DNA labelling Kit (Amersham製) を用いて³²P-dCTPで標識した。ハイブリダイゼーションは前述 (実施例2) と同一組成のハイブリダイゼーション液で、65℃、16時間行ない、最終洗浄は0.1 × SSCで50℃、20分を2回振蕩して行なった。1回めのスクリーニングで陽性であったファージを、再び同様にスクリーニングすることにより、3種の陽性ファージを得、ファージを純化後ファージDNAを得た。このファージDNAをEcoRIで切断し、cDNAをプラスミドpTZ18R (Pharmacia製) にサブクロニングし塩基配列を決定した。得られた3種のcDNAクローン (SpAT#1 ~ 3) のうち、SpAT#1は長さ約1.5 kbpで、そのオープンリーディングフレームのアミノ酸配列を他の植物のATaseのアミノ酸配列と比較すると、N末側のアミノ酸が欠けていることが明らかになった。そこで、SpAT#1をプローブとしてハウレンソウcDNAライブラリー

をスクリーニングし、約 600 bp の cDNA クローン (SpAT#4) を得た。SpAT# 1 と SpAT# 4 の位置関係を第 4 図に示す。塩基配列を決定した結果、SpAT# 4 は SpAT#1 より N 末側に約 120 bp 伸びたクローンで、残りの約 500 bp の塩基配列は SpAT#1 と完全に一致した。また、SpAT#1 のオープンリーディングフレームと読み枠が合う翻訳開始コドン (ATG) が、N 末側に伸びた約 120 bp 中に見いだされた。従って、両クローンを合わせる事により完全長のオープンリーディングフレームが得られることが示された。この両クローンを合わせた cDNA クローン (SpAT#14) の塩基配列およびオープンリーディングフレームのアミノ酸配列を第 5 図および 6 図 (配列番号: 1 に対応) に示す。cDNA の長さは、1,656 bp であり、その中に 1,413 bp のオープンリーディングフレームが存在した。ここにはアミノ酸 472 個、分子量 52,177 のタンパク質がコードされていると推定された。他の植物由来 ATase のアミノ酸配列とのホモロジーは、葉緑体への移行シグナル (トランジットペプチド) と推定される N 末端から約 100 個のアミノ酸からなる配列を除けば 60% 強であり、移行シグナルを含む全体では 50% 強であった (GENETYX データベース解析ソフト; ソフトウェア開発製)。

実施例 4 ホウレンソウ mRNA のノーザン解析

実施例 2 のノーザン解析に供したナイロンメンブレンを、0.01% SDS 液中で 100℃、15 秒間加熱すること

により、ハイブリダイズしているプローブDNAをはがした。ホウレンソウATaseのcDNAクローンSpAT#1をプローブとしてこのメンブレンを用いてノーザン解析を行なった。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の温度はそれぞれ65℃および50℃とした〔ハイブリダイゼーション液および洗浄液の組成は前述（実施例2）のものと同一である〕。その結果、ホウレンソウmRNAを転写したレーンで約2kbの明瞭なバンドが検出された。この位置は、カボチャおよびシロイヌナズナのmRNAをそれぞれのATase cDNAをプローブとして解析した時検出されたバンドと同じであった。このオートラジオグラム（模写）を第7図に示す。

実施例 5 シロイヌナズナATase cDNAのタバコ細胞への導入

ホウレンソウATaseをコードするcDNAを以下のようにしてタバコ細胞に導入した。

（1）植物発現用ベクタープラスミドの構築

植物発現用バイナリープラスミドpBI121(Clontech)を制限酵素SacIとBamHIで切断し、Klenowフラグメントで切断端を平滑末端とした後、T4 DNAライゲースを用いて両末端を連結した。こうして得たプラスミドpBI121(-GUS)はβ-Glucuronidase遺伝子（GUS遺伝子）を含まず、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターとノパリン合成酵素(NOS)ターミネーターの間に制限酵素XbaI

と *Bam*HI のサイトをユニークサイトとして有する。

実施例 3 で得た cDNA (SpAT#14) を含むプラスミドを制限酵素 *Eco*RI で切断し、低融点アガロースゲル電気泳動によりベクタープラスミド pTZ18R とハウレンソウ *A T a s e* の cDNA を分離し、cDNA をゲルから切り出して調製した。さらに *Klenow* フラグメントで切断端を平滑末端とした。一方上記で得たプラスミド pBI121 (-GUS) を制限酵素 *Xba*I で切断後、cDNA と同様に処理をして両末端を平滑末端とした。こうして得た *A T a s e* の cDNA とプラスミド pBI121 (-GUS) を T4 DNA ライゲースを用いて連結することにより、35S プロモーター、ハウレンソウ *A T a s e* の cDNA、NOS ターミネーターを含む発現用プラスミド pBI121-35SSPT を得た。

(2) pBI121-35SSPT のアグロバクテリウムへの導入

(i) DNA 導入用アグロバクテリウムの調製

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 (Clontech) を、50ml の YEB 培地 (1 l 当りビーフエキス 5 g、酵母エキス 1 g、ペプトン 1 g、ショ糖 5 g、2 mM $MgSO_4$ 、pH 7.4) に接種し、28℃ で 24 時間培養後、培養液を 3000 rpm、4℃、20 分の遠心で集菌した。菌体を 10ml の 1 mM HEPES (pH 7.4) で 3 回洗った後、3 ml の 10% グリセロールで 1 回洗い、最終的に 3 ml の 10% グリセロールに懸濁して DNA 導入用アグロバクテリウム菌液とした。

(i i) pBI121-35SSPT のアグロバクテリウムへの導入

(i) で得たアグロバクテリウム菌液 $50\mu\text{l}$ および前記 (1) で得たプラスミド pBI121-35SSPT $1\mu\text{g}$ をキュベットに入れ、エレクトロポレーション装置 (Gene Pulser; BioRad) を用いて $25\mu\text{F}$ 、 2500V 、 200Ω の条件で電気パルスをかけ、プラスミド DNA をアグロバクテリウムに導入した。この菌液をエッペンドルフチューブに移し、 $800\mu\text{l}$ の SOC 培地 (1 l 当たりトリプトン 20g 、酵母エキス 5g 、 NaCl 0.5g 、 2.5mM KCl 、 $\text{pH}7.0$) を加え、 28°C で 1.5 時間静置培養した。この培養液 $50\mu\text{l}$ を、 100ppm のカナマイシンを含む YEB 寒天培地 (寒天 1.2%) 上にまき、 28°C で 2 日間培養した。

得られたコロニー群からシングルコロニーを選び、このコロニーからアルカリ法でプラスミド DNA を調製した。このプラスミド DNA を適当な制限酵素で消化後 1% アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、 ^{32}P でラベルしたハウレンソウ A T a s e の cDNA をプローブとしたサザン分析により、プラスミド pBI121-35SSPT を含んでいることを確認した。このアグロバクテリウムを ALBSSPT と呼ぶ。

(3) タバコの形質転換

(i) アグロバクテリウムの調製

上記 (2) で得られた ALBSSPT を、 50ppm のカナマイシンを含む LB 液体培地で 28°C 、 12 時間振とう培養した。培養液 1.5ml を $10,000\text{rpm}$ 、 3 分間遠心して集菌後、カ

ナマイシンを除くために1 mlのLB培地で洗浄した。さらに10,000 rpm、3分間遠心して集菌後、1.5 mlのLB液体培地に再懸濁し感染用菌液とした。

(i i) タバコ葉へのアグロバクテリウムの感染

若いタバコ葉を採取し、0.5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に10分間浸せき後、滅菌水で3回洗い、滅菌済みの濾紙上で水を拭って感染用の葉とした。この葉を1片が1 cm²になるようにメスで無菌的に切断し、(i)で得た菌液上に葉の裏を上にして置き、2分間静かに振とうした後、滅菌済み濾紙上に葉を置いて過剰のアグロバクテリウムを除いた。シャーレ内のMS-B5培地（ベンジルアデニン1.0 ppm、ナフタレン酢酸0.1 ppmおよび寒天0.8%を含む）（T. Murashige and F. Skoog, Plant Physiol., 15:473, 1962）上に、1 mlのタバコ（品種：Xanthi-nc）の懸濁培養細胞を広げ、その上にワットマンNo.1濾紙（φ7.0 cm）を置き、この濾紙に裏を上にして葉を置いた。シャーレをパラフィルムでシールし、16時間明、8時間暗の周期で25℃、2日間培養した。ついでクラホラン（ヘキスト）250 ppmを含むMS-B5培地上に移し、同様に10日間培養してアグロバクテリウムを除去した。このカルスをラン250 ppmおよびカナマイシン100 ppmを含むMS-B5培地上に移し、同様に7日間培養した。この間に葉片の周囲がカルス化した。このカルスをクラホラン250 ppmおよびカナマイシン100 ppmを含むMS-B5

培地上に移し増殖させ、以下の試験の材料として用いた。

このようにして得られたタバコの形質転換体（タバコ細胞 S P I）は、FERM B P - 4 8 7 4 として生命工学工業技術研究所に寄託（平成 6 年（1994 年）11 月 7 日）されている。

実施例 6 形質転換タバコ細胞のホスファチジルグリセロールの脂肪酸分析

実施例 5 で得た形質転換タバコ細胞および、対照として、非形質転換タバコ細胞から、以下の方法によりホスファチジルグリセロール（P G）を調製し、その脂肪酸組成を分析した。

（1）全脂質の抽出

脂質の抽出は Bligh-Dyer 法 (Can. J. Biochem. Physiol., 37:911, 1959) で行った。0.1 % のブチルヒドロキシトルエンを含むイソプロパノール 5 ml を 80℃ に温めておき、そこに湿重量 2 g の細胞をメスで細断して素早く入れ、80℃ で 5 分間処理後、室温に冷やした。これに 20 ml のクロロホルム：メタノール（1：2、体積比）を加え、ホモジナイザーで細胞を破碎後、15 分間静置した。これにクロロホルム 12 ml および蒸留水 12 ml を加え激しく混合した後、3000 rpm、4℃、30 分間の遠心で水層と有機層の二層に分け、有機層（下層）を回収した。これに適当量のエタノールを加えて、ロータリーエバポレ

ーターを用い、30℃減圧下で溶媒を除いた。これを2 mlのクロロホルム：メタノール（1：4、体積比）に溶かし、全脂質抽出物とした。

（2）脂質の分画

DEAE-Toyopearl 650C（東ソー）の懸濁液25 mlを1 M酢酸ナトリウム水溶液（pH7.0）25 mlと混ぜ酢酸型とした。これを蒸留水、メタノールで順次洗浄し、最後にメタノールに懸濁して、内径2 cmのカラムに高さ1.5 cmまで詰め、さらに50 mlのクロロホルム：メタノール（1：4、体積比）で洗浄した。

全脂質抽出物をカラムにのせ、50 mlのクロロホルム：メタノール（1：4、体積比）でモノガラクトシルジアシルグリセロール、ジガラクトシルジアシルグリセロール、ホスファチジルエタノール、ホスファチジルコリンを溶出して除いた。次に50 mlの酢酸でホスファチジルセリンを溶出して除き、15 mlのクロロホルム：メタノール（1：4、体積比）で酢酸を洗浄した後、50 mlのクロロホルム：メタノール：10 M酢酸アンモニウム水溶液（20：80：0.2、体積比）でPG、スルフォキノボシルジアシルグリセロール、ホスファチジリンノシトールを含む画分を得た。この画分に15 mlのエタノールを加え、減圧下で溶媒を除いた。これを200 μ lのクロロホルム：メタノール（2：1、体積比）に溶かした。

(3) 薄層クロマトグラフィー (TLC) による P G の分離精製と脂肪酸分析

(2) で得た画分をシリカゲル-TLC プレート # 5721 (Merck) で分離した。展開溶媒にはクロロホルム : アセトン : メタノール : 酢酸 : 水 (50 : 20 : 10 : 15 : 5、体積比) を用いた。TLC で分離後、プリムリンを噴霧して紫外光下で蛍光発色させ、標準となる P G と同じ移動度を示す P G の画分をシリカゲルごと削り取り、ネジ栓付試験管に入れた。この中に 2.5 ml のメタノール性 5 % 塩酸を加え、完全密閉下 85℃ で 2 時間半反応させ脂肪酸をメチル化した。生じた脂肪酸メチルエステルを 2.5 ml のヘキサンで 4 回抽出し、減圧下で溶媒を除去して濃縮した。脂肪酸メチルの分析には、ガスクロマトグラフィーを用いた。脂肪酸メチルの分画には、ガスクロマトグラフ GC-17A A W F W (島津製作所) を用い、脂肪酸の同定は標準脂肪酸メチルとの保持時間を比較して行った。定量にはクロマトパック C-R7A plus (島津製作所) を用いた。結果を表 1 に示す。

P G に結合した脂肪酸中の飽和脂肪酸 (16:0 + 16:1t + ステアリン酸 (18:0)) 含量は、対照の非形質転換タバコでは $72 \pm 1\%$ であるのに対し、ハウレンソウ A T a s e を発現している形質転換タバコ細胞では $65 \pm 1\%$ と低くなっていた。P G の 2 位には 16:0 と 16:1t のみが結合していることを考えると、脂肪酸分析の結果から、

P G 中の飽和分子種含量は、非形質転換タバコで $44 \pm 2\%$ 、形質転換タバコ細胞で $30 \pm 2\%$ と計算される。

表 1

P Gの脂肪酸および分子種組成

植 物	16:0+16:1t+18:0	飽和分子種
非形質転換タバコ	72 \pm 1	44 \pm 2
形質転換タバコ	65 \pm 1	30 \pm 2

上述のように、本発明によりハウレンソウ由来の ATase をコードする DNA 鎖およびその用途が提供された。

本発明 DNA 鎖を、本発明方法に従って種々の植物に導入・発現させればその P G の性質がハウレンソウと似たものになる。

ハウレンソウ由来の ATase は、その DNA 構造が既知の低温耐性植物（シロイヌナズナおよびエンドウ）由来の ATase よりも不飽和脂肪酸（オレイン酸）-ACP に対する基質選択性が高いことが本発明者らによって確認され、本発明の DNA 鎖を公知の方法に従って低温感受性植物に導入し発現させれば、既知の遺伝子を用いた場合よりもさらに強い耐冷能を植物に付与することができる。

ハウレンソウ由来の ATase が他の低温耐性由来の ATase よりも不飽和脂肪酸に対する基質選択性が著しく高いということが本発明において確認され、該 ATase がこのような特性を有することは思いがけなかつ

たことと解される。

また、本発明で得られたDNAをプローブに用いれば、低温耐性植物中に存在し基質選択性が類似の本酵素遺伝子を遺伝子工学の分野で慣用されている方法により容易にクローニングできるものと思われる。

産業上の利用可能性

本発明DNA鎖を低温感受性植物に導入し発現させることにより、その植物のPGの不飽和脂肪酸の組成が大幅に高められることから、本発明のDNA鎖およびそれを用いた方法は、低温感受性植物に強い低温耐性を与えることができる遺伝子および方法として有用である。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 1 6 5 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : ホウレンソウ

株名 : Spinacia oleracea L.

配列の特徴

特徴を表わす記号 : transit peptide

存在位置 : 2 3 8 . . 3 6 0 (または 5 5 . . 3 6 0)

特徴を決定した方法 : E

配列

CCGCCATTCC CATTCTCTCT CTCTCTCTCT CTCTCTCTCC TCATACCAGA AAAT ATG TTA 60
 Met Leu
 1
 GTC TTA TCT TCC TCT GCT CCA CCC GTT CTC GAG GTG TGC AAA GAT AGG 108
 Val Leu Ser Ser Ser Ala Pro Pro Val Leu Glu Val Cys Lys Asp Arg
 5 10 15
 GTT TCT TCT TCG TTT TCT ACT TCC TCG TCG TCT TCT TCG TCG GCG TTT 156
 Val Ser Ser Ser Phe Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Phe
 20 25 30
 TCT GCG GTG GTG TTT CGT CGG AGT TTT TTC ACT CGG TTT AAC TCG TCT 204
 Ser Ala Val Val Phe Arg Arg Ser Phe Phe Thr Arg Phe Asn Ser Ser
 35 40 45 50
 CTA ATA TGC TGC TGC TCT TCC AAG CTC AAA TTA ATG GCG GAC ACT GCT 252
 Leu Ile Cys Cys Cys Ser Ser Lys Leu Lys Leu Met Ala Asp Thr Ala
 55 60 65
 CTT CCG TCC TCG TCT TCT TCG ACG TCT GCT TCT GCT TCT TAT TCT GCT 300
 Leu Pro Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ala Ser Ala Ser Tyr Ser Ala
 70 75 80
 GCT GCG AAG TCT GTT GAA GAG GAG AAT CAC GAG ATT CCT GTT AAG AAA 348
 Ala Ala Lys Ser Val Glu Glu Glu Asn His Glu Ile Pro Val Lys Lys
 85 90 95
 GAA GAT GAC AAT CAA CTT CTT CGT TCT CGC ACT TAT CGT AAC GTT CGT 396
 Glu Asp Asp Asn Gln Leu Leu Arg Ser Arg Thr Tyr Arg Asn Val Arg
 100 105 110

TCT GCA GAA GAG CTG ATA TCT GAA ATA AAA AGG GAA TCA GAA ATT GGA	444
Ser Ala Glu Glu Leu Ile Ser Glu Ile Lys Arg Glu Ser Glu Ile Gly	
115 120 125 130	
AGG TTA CCT AAA AGT GTT GCT TAT GCT ATG GAG GGA CTT TTT CAC TAC	492
Arg Leu Pro Lys Ser Val Ala Tyr Ala Met Glu Gly Leu Phe His Tyr	
135 140 145	
TAT CGC AAT GCA GTC CTT TCA AGT GGA ATT TCT CAT GCT GAT GAA ATA	540
Tyr Arg Asn Ala Val Leu Ser Ser Gly Ile Ser His Ala Asp Glu Ile	
150 155 160	
GTG TTG TCA AAC ATG AGT GTT ATG CTT GAT TTT GTT TTG TTG GAT ATT	588
Val Leu Ser Asn Met Ser Val Met Leu Asp Phe Val Leu Leu Asp Ile	
165 170 175	
GAG GAC CCT TTT GTA TTT CCA CCG TTT CAC AAA GCT ATT CGA GAG CCT	636
Glu Asp Pro Phe Val Phe Pro Pro Phe His Lys Ala Ile Arg Glu Pro	
180 185 190	
GCT GAC TAT TAT TCC TTT GGT CAA GAT TAC ATT CGG CCA TTG GTA GAT	684
Ala Asp Tyr Tyr Ser Phe Gly Gln Asp Tyr Ile Arg Pro Leu Val Asp	
195 200 205 210	
TTT GGA AAT TCA TAT GTT GGT AAC ATC GCC ATT TTC CAA GAA ATG GAG	732
Phe Gly Asn Ser Tyr Val Gly Asn Ile Ala Ile Phe Gln Glu Met Glu	
215 220 225	
GAG AAG CTT AAG CAG GGT GAC AAC ATC ATC TTA ATG TCC AAC CAT CAA	780
Glu Lys Leu Lys Gln Gly Asp Asn Ile Ile Leu Met Ser Asn His Gln	
230 235 240	

AGT GAA GCA GAT CCC GCA GTG ATT GCA TTA CTT CTG GAG AAG ACA AAT	828
Ser Glu Ala Asp Pro Ala Val Ile Ala Leu Leu Leu Glu Lys Thr Asn	
245 250 255	
TCA CTA ATC GCA GAA AAC TTG ATC TAC ATA GCA GGT GAT CGA GTT ATA	876
Ser Leu Ile Ala Glu Asn Leu Ile Tyr Ile Ala Gly Asp Arg Val Ile	
260 265 270	
ACA GAT CCT CTT TGC AAG CCC TTT AGC ATG GGA AGG AAT CTT CTT TGT	924
Thr Asp Pro Leu Cys Lys Pro Phe Ser Met Gly Arg Asn Leu Leu Cys	
275 280 285 290	
GTT TAC TCT AAG AAG CAC ATG TAT GAT GAT CCC GAG CTT GTT GAT GTA	972
Val Tyr Ser Lys Lys His Met Tyr Asp Asp Pro Glu Leu Val Asp Val	
295 300 305	
AAG AAA AGA GCA AAT ACA AGG AGT TTG AAA GAG TTG GTC TTA CTT TTA	1020
Lys Lys Arg Ala Asn Thr Arg Ser Leu Lys Glu Leu Val Leu Leu Leu	
310 315 320	
AGA GGT GGT TCA AAA ATA ATC TGG ATT GCA CCC AGT GGT GGA AGA GAT	1068
Arg Gly Gly Ser Lys Ile Ile Trp Ile Ala Pro Ser Gly Gly Arg Asp	
325 330 335	
CGT CCA GAT GCT GTC ACT GGT GAA TGG TAC CCG GGA ACT TTT GAT TTC	1116
Arg Pro Asp Ala Val Thr Gly Glu Trp Tyr Pro Gly Thr Phe Asp Phe	
340 345 350	
GCT GCA TTG GAT AAT ATG AGA AGG CTT GTG GAA CAT GCT GGT AGA CCT	1164
Ala Ala Leu Asp Asn Met Arg Arg Leu Val Glu His Ala Gly Arg Pro	
355 360 365 370	

GGG CAT ATT TAT CCA TTA GCA TTA TTG TGC TAT GAC ATT ATG CCC CCT	1212
Gly His Ile Tyr Pro Leu Ala Leu Leu Cys Tyr Asp Ile Met Pro Pro	
375 380 385	
CCA GCA CAG GTT GAA AAG GAA ATT GGG GAG AAA AGA GTA ATG TCC TTT	1260
Pro Ala Gln Val Glu Lys Glu Ile Gly Glu Lys Arg Val Met Ser Phe	
390 395 400	
CAC GGA GTT GGG GTA TCT GTG GAA CCA GAG ATT AAC TAC AAT GAT GTT	1308
His Gly Val Gly Val Ser Val Glu Pro Glu Ile Asn Tyr Asn Asp Val	
405 410 415	
TCT CTT GGT TGC AAA AAT GAT GAA GAG GCT AAG TCA GTT TAT GGA CAA	1356
Ser Leu Gly Cys Lys Asn Asp Glu Glu Ala Lys Ser Val Tyr Gly Gln	
420 425 430	
GCG TTG TAC AAT TCT GTG AAT GAA CAA TAT AAT GTC CTC AAA GCT GCT	1404
Ala Leu Tyr Asn Ser Val Asn Glu Gln Tyr Asn Val Leu Lys Ala Ala	
435 440 445 450	
ATA CAT GGA AAA CAA GGC TCA GGT GCA TCA ACG CCG ACT ACT TCT CTG	1452
Ile His Gly Lys Gln Gly Ser Gly Ala Ser Thr Pro Thr Thr Ser Leu	
455 460 465	
TCA CAA CCT TGG GCC AGT TGACATTAGT GTGCCCTTTT GCTTTCTTTT	1500
Ser Gln Pro Trp Ala Ser***	
470	
AAGGTTGATA TTTGCATACT TGTAGTCTTG TAGAGAACTC GATCATAGCT TACCGGGTTG	1560
CTGTCCTGTC ATTTTACAC ACACCTTCAA GTGAACAATT TTGAGTGCTC TATTGCTTGT	1620
TGAGGTAGCA TGGGAAAATT CTTTTTTTTG GGGGGA	1656

請 求 の 範 囲

1. グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号 : 1 に示されているアミノ酸配列のうち 103 位から 472 位までのものであるポリペプチドをコードする塩基配列を有することを特徴とする、グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼの生物工学的産生能を有する DNA 鎖。

2. ポリペプチドをコードする塩基配列が配列番号 : 1 に示されている塩基配列のうち、361 位から 1470 位までのものまたはその縮重異性体である、請求の範囲第 1 項記載の DNA 鎖。

3. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載された DNA が組み込まれ、この DNA の発現によってこのグリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼが産生されていることにより、脂質に結合した脂肪酸中の不飽和脂肪酸の含量が本来の組成よりも高くなったものであることを特徴とする植物。

4. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載された DNA を植物細胞に組み込み、植物体中でこの DNA を発現させ、その結果としてこのグリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼを産生させることにより、この植物の脂質に結合した脂肪酸中の不飽和脂肪酸の含

量を本来の組成よりも高くすることを特徴とする、植物の脂質中の脂肪酸組成を変化させる方法。

5. 本来低温傷害を受ける植物であって、請求の範囲第1項または第2項に記載されたDNAが組み込まれ、このDNAの発現によってこのグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼが産生され、この植物の細胞の生体膜中に含まれているホスファチジルグリセロールに結合した脂肪酸中の不飽和脂肪酸の含量が本来の組成よりも高くなったことにより、この植物の本来傷害を受ける温度より低い温度でも傷害を受けなくなったものであることを特徴とする植物。

6. 請求の範囲第1項または第2項に記載されたDNAを植物細胞に組み込み、植物体中でこのDNAを発現させ、その結果としてこのグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼを産生させ、この植物の細胞の生体膜中に含まれているホスファチジルグリセロールに結合した脂肪酸の組成を変化させて不飽和分子種含量を高めることにより、本来低温傷害を受ける植物に、この植物が本来傷害を受ける温度より低い温度でも傷害を受けない性質を与えることを特徴とする、植物の温度に対する感受性を変化させる方法。

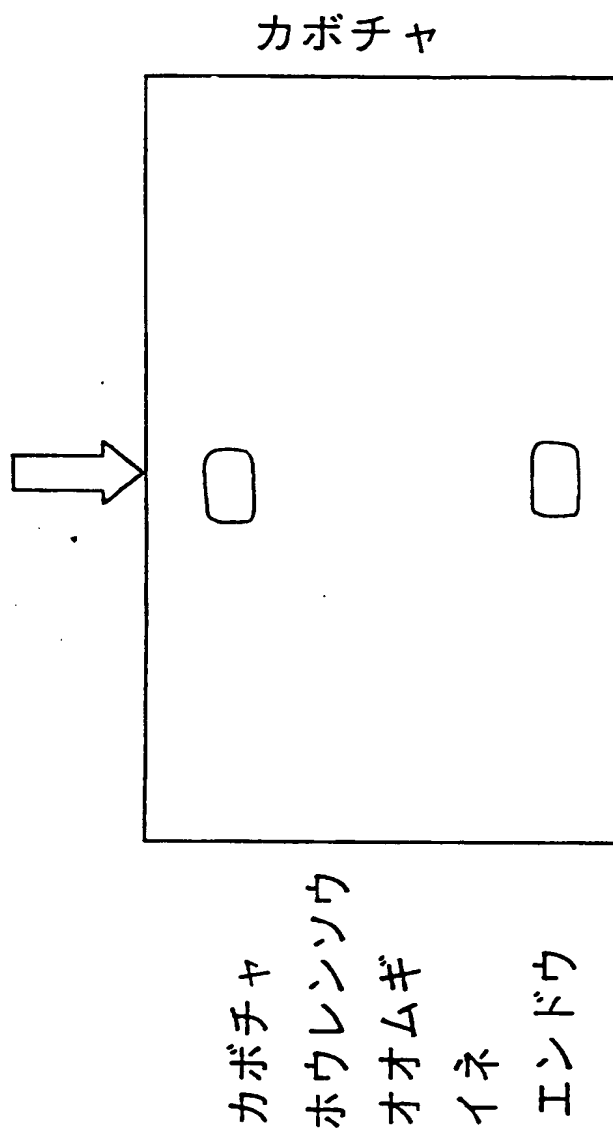


FIG. 1

カボチャ	33	SRKFLDVRSE	EELLSCIKKE	TEACKLPPNV	AAGMEELYQN	YRNAVIESGN
シロイヌナズナ	95	SRTFLDARSE	QDULSGIKKE	AEAGRLLPANY	AAGMEELYWN	YKNAVLSSGA
エンドウ	93	SRTFLNAQNE	QDYLSCIKKE	VEAGTLPASI	AAGMEEVYLN	YKSAVIKSGD
キュウリ	106	SRAFLLRSE	EELLSCIRRE	TEACKLPSNV	<u>AAGMEELYQN</u>	YKNAVFESGN
1						
カボチャ	83	PEADEIVLSN	MTVAL-DRIL	LDVEDPFVFS	SHKKAIREPF	DYYIFGQNYI
シロイヌナズナ	145	SRADETIVSN	MSVAF-DRML	LGVEDPYTFN	PYHKAVREPF	DYMFVHTYI
エンドウ	143	PKANEIVLSN	MT-ALLDRIF	LDVKEPFVFE	ABHKAKREPF	DYMFGQNYI
キュウリ	156	PKADEIVLSN	MTVAL-DRIL	LDVEDPFNFS	<u>PHKKAIREPF</u>	DYTFGQNYV
2						
カボチャ	132	RPLIDFNSF	VGNLSIFKDI	EELQQCHNV	VLISNHQTEA	DPAIISLLE
シロイヌナズナ	194	RPLIDFANSY	VGNASIFSEL	EDKIRQCHNI	VLISNHQSEA	DPAVISLLE
エンドウ	192	RPLVDFETSY	VGNMPLFIQM	EEQLKQCHNI	ILMSNHQSEA	DPAIIALLE
キュウリ	205	RPLIDFENSF	VGNLSIFKDI	EELKHQCHNV	VLISNHQTEA	DPAIISLLE
3, 4						
カボチャ	182	KTNPIAENT	IF-VAGDRVL	ADPLCKPFPSI	GRNLICVYSK	KHMFDIPELT
シロイヌナズナ	244	AQSPFIGEN-	IKCVAGDRVI	TDPLCKPFPSM	GRNLICVYSK	KHMNVDPELY
エンドウ	242	MRLPHIAENL	IY-VAGDRVI	TVPLCKPFPSI	GRNLICVYSK	KHMLDNPELY
キュウリ	255	KTNPIAENM	IY-VAGDRVI	ADPLCKPFPSI	<u>GRNLICVYSK</u>	<u>KHMLDIPELA</u>

FIG. 2

カボチャ	231	ETKREANTRS	LKEHALLRG	GSQLIWIAPS	GGDRPDPST	GEWYPAPFDA
シロイヌナズナ	293	DMKREANTRS	LKEHATMLRS	GGQLIWIAPS	GGDRPNPST	GEWFPAPFDA
エンドウ	291	DMKREANTRS	RKEMAMLLRS	GSQIIWIAPS	GGDRPVPANS	GEWAPAPFDS
キュウリ	304	ETKREANTRS	LKEHALLRG	GSQLIWIAPS	GGDRPDPST	GEWYPAPFDA
						5
カボチャ	281	SSVDNMRRLL	QHSDDPCHLF	PLALLCHDIM	PPSQVEIEI	GEKRVIAFNG
シロイヌナズナ	343	SSVDNMRRLL	EHSGAPGHY	PMSLLCYDIM	PPPPQVEKEI	GEKRLVGFHG
エンドウ	341	SSVDNMRRLL	DHSGPPGHY	PLAILCHDIM	PPPLKVEKEI	GEKRIISYHG
キュウリ	354	SSVDNMRRLL	QHSAGPHLY	PLALLCYDIM	PPSQVEIEI	GEKRVISFNG
						6
カボチャ	331	AGLSVAPEIS	FEEIAATHKN	PEEVREAYSK	ALFDSVAMQY	NVLKTAISCK
シロイヌナズナ	393	TGLSIAPEIN	FSDVTADCES	PNEAKEAYSQ	ALYKSVNEQY	EILNSAIXHR
エンドウ	391	TGISTAPEIS	FSNTTAAACEN	PEKAKDAYTK	ALYDSVTEQY	DVLKSAIHGK
キュウリ	404	TGLSVGPEIS	FDEIAASRDN	PDEVREAYSK	ALYDSVAKQY	NVLKAAIDGK
カボチャ	381	QGLCASTADY	SLSQPW	(396)		
シロイヌナズナ	443	RGVEASTSRV	SLSQPN	(459)		
エンドウ	441	RGLOASTPVV	SLSQPN	(457)		
キュウリ	454	QLEASVADY	SLSQWI	(470)		

FIG. 3

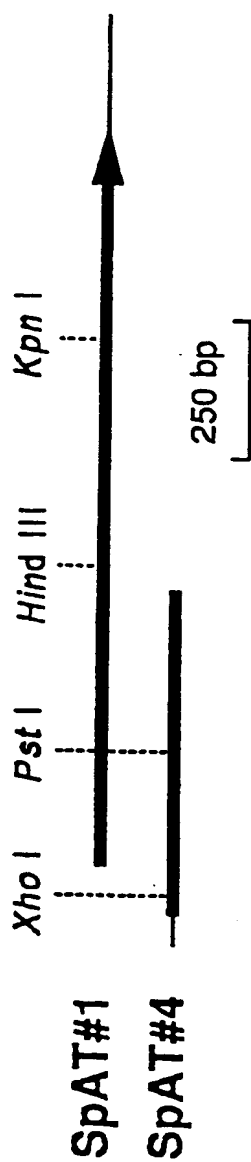


FIG. 4

FIG. 5

```

781 AGTGAAGCAGATCCCGCAGTGATTGCATTACTTCTGGAGAAGACAAATTCACCTAATCGCA 840
243 SerGluAlaAspProAlaValIleAlaLeuLeuLeuGluLysThrAsnSerLeuIleAla 262

841 GAAAACTTGATCTACATAGCAGGTGATCGAGTTATAACAGATCCTCTTTGCAAGCCCTTT 900
263 GluAsnLeuIleTyrIleAlaGlyAspArgValIleThrAspProLeuCysLysProPhe 282

901 AGCATGGGAAGGAATCTTCTTTGTGTTTACTCTAAGAAGCACATGTATGATGATCCCGAG 960
283 SerMetGlyArgAsnLeuLeuCysValTyrSerLysLysHisMetTyrAspAspProGlu 302

961 CTTGTTGATGTAAAGAAAAGAGCAAATACAAGGAGTTTGAAAGAGTTGGTCTTACTTTTA 1020
303 LeuValAspValLysLysArgAlaAsnThrArgSerLeuLysGluLeuValLeuLeuLeu 322

1021 AGAGGTGGTTCAAAAATAATCTGGATTGCACCCAGTGGTGGAAGAGATCGTCCAGATGCT 1080
323 ArgGlyGlySerLysIleIleTrpIleAlaProSerGlyGlyArgAspArgProAspAla 342

1081 GTCACTGGTGAATGGTACCCGGGAACTTTTGATTTGCTGCATTGGATAATATGAGAAGG 1140
343 ValThrGlyGluTrpTyrProGlyThrPheAspPheAlaAlaLeuAspAsnMetArgArg 362

1141 CTTGTGGAACATGCTGGTAGACCTGGGCATATTTATCCATTAGCATTATTGTGCTATGAC 1200
363 LeuValGluHisAlaGlyArgProGlyHisIleTyrProLeuAlaLeuLeuCysTyrAsp 382

1201 ATTATGCCCCCTCCAGCACAGGTTGAAAAGGAAATTGGGGAGAAAAGAGTAATGTCCTTT 1260
383 IleMetProProProAlaGlnValGluLysGluIleGlyGluLysArgValMetSerPhe 402

1261 CACGGAGTTGGGGTATCTGTGGAACCAGAGATTAACCTACAATGATGTTTCTCTTGGTTGC 1320
403 HisGlyValGlyValSerValGluProGluIleAsnTyrAsnAspValSerLeuGlyCys 422

1321 AAAAATGATGAAGAGGCTAAGTCAGTTTATGGACAAGCGTTGTACAATTCTGTGAATGAA 1380
423 LysAsnAspGluGluAlaLysSerValTyrGlyGlnAlaLeuTyrAsnSerValAsnGlu 442

1381 CAATATAATGTCCTCAAAGCTGCTATACATGGAAAACAAGGCTCAGGTGCATCAACGCCG 1440
443 GlnTyrAsnValLeuLysAlaAlaIleHisGlyLysGlnGlySerGlyAlaSerThrPro 462

1441 ACTACTTCTCTGTCACAACCTTGGGCCAGTTGACATTAGTGTGCCCTTTTGTCTTCTTTT 1500
463 ThrThrSerLeuSerGlnProTrpAlaSer*** 472
      ↑ B
1501 AAGGTTGATATTTGCATACTTGTAGTCTTGTAGAGAACTCGATCATAGCTTACCGGGTTG 1560
1561 CTGTCCTGTCATTTTTACACACACCTTCAAGTGAACAATTTTGAGTGCTCTATTGCTTGT 1620
1621 TGAGGTAGCATGGGAAAATTCTTTTTTTTGGGGGGA 1656

```

FIG. 6

6/7

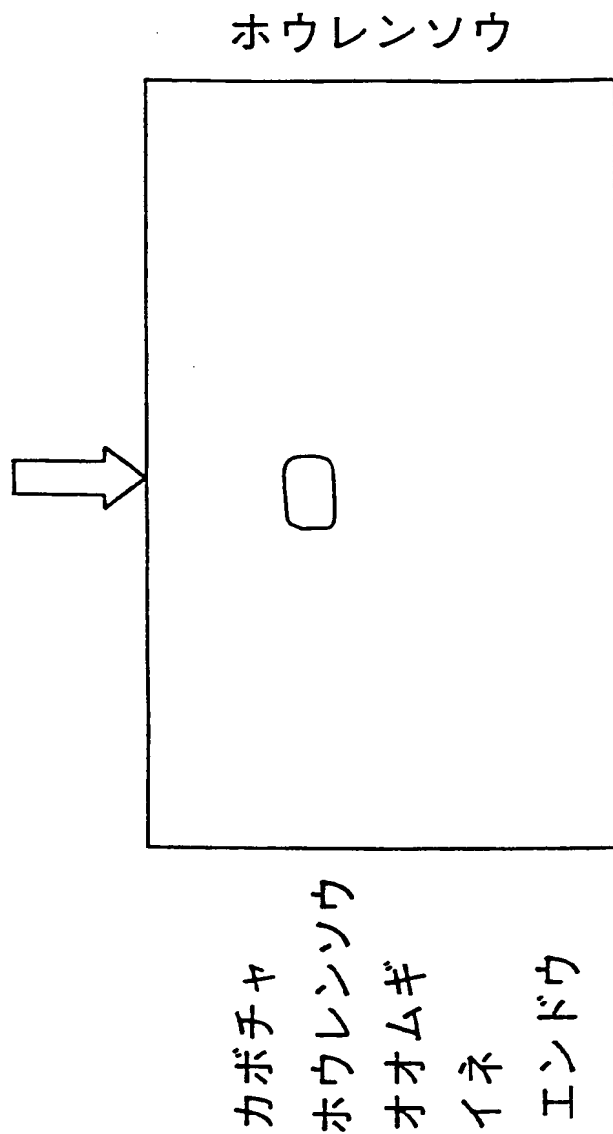


FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01956

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12N15/54, C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12N15/54, C12N9/10, C12N5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPIL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, A, 1-235594 (Norio Murata), September 20, 1989 (20. 09. 89) (Family: none)	1-6
Y	Eur. J. Biochem. Vol. 129 (1983) p. 629-636	1-6
Y	Science Vol. 240 (1988), Carol A. Rhodes et al. "Genetically transformed maize plants from protoplasts" p. 204-207	5-6
Y	Nature Vol. 324, No. 13 (1986), Randall K, Saiki et al. "Analysis of enzymatically amplified β -globlin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes" p. 163-166	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 25, 1995 (25. 01. 95)

Date of mailing of the international search report

February 14, 1995 (14. 02. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/54, C12N5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/54, C12N9/10, C12N5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPIL

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, A, 1-235594 (村田 紀夫), 20. 9月. 1989 (20. 09. 89) (ファミリーなし)	1-6
Y	Eur. J. Biochem. 第129巻 (1983) p. 629-636	1-6
Y	Science 第240巻 (1988), Carol A. Rhodes et al. 「Genetically transformed maize plants from protoplasts」 p. 204-207	5-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 01. 95

国際調査報告の発送日

14. 02. 95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

種 村 慈 樹

4 B 9 3 5 9

電話番号 03-3581-1101 内線

3449

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Nature 第324巻第13号(1986), Randall K, Saiki et al. 「Analysis of enzymatically amplified β -globlin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes」 p. 163-166	1-6

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1992年7月)

11
12
13
14
15